

ストレプトリジン-S形成に及ぼすリボ核酸の影響について

金沢大学医学部薬理学教室 (主任: 正印 達教授)

林 義 則

(昭和57年7月24日受付)

ブラウン細胞破壊器によってえられるストレプトリジン-S (streptolysin S, SLS) 産生溶連菌の無細胞抽出液 (cell free extract, CFE) の中の溶血物質 (intracellular hemolysin, ICH) は菌をリボ核酸の ribonuclease-resistant fraction (RNase core) 加培地中で培養すると SLS 産生が増加するのに逆相関して ICH は減少していた。CFE を RNase core と共に Bernheimer's basal medium 中で 37°C に静置すると、ICH の moiety が RNase core に移行結合するとされている如く、RNase core-ICH を形成し溶血活性も約 5 倍増強した。この溶血活性増強は CFE の遠心沈澱物を加えることでさらに高まった。RNase core-ICH はカラムクロマトグラフィーおよび熱安定性に関する実験では SLS と似た性状を示し、ICH と異なっていた。また、ICH には全く影響を与えないヒアルロニダーゼや α -アミラーゼによって RNase core-ICH の溶血活性は SLS と同様に減弱したが、バリダーゼ、キモトリプシンやトリプシンによって ICH と同様な影響をうけた。予め 37°C の加温処理を行って溶血活性が消失した CFE に RNase core と ATP を加えて 37°C 下におくと再び溶血活性がみられ、あらたに ICH がつくられたものと想定された。以上のことから菌体内で合成・貯蔵された ICH は細胞壁介在のもとで RNase core と結合し溶血活性の強い熱安定性の SLS を産生すると共に、RNase core はこれらの過程を促進すると考えられた。

Key words Hemolytic streptococci, Intracellular hemolysin, Streptolysin S, RNA

A群溶連菌の溶血毒素 hemolysin については菌体外溶血毒素と菌体内溶血毒素に大別されているが、これに属しない溶血毒素も報告されている。また、溶血毒素はその性状によって酸素に安定なストレプトリジン-S (streptolysin S, 以下 SLS と略) と酸素に不安定なストレプトリジン-O (streptolysin O, 以下 SLO と略) に分けられている。菌体外溶血毒素の SLS については、1940 年 Okamoto¹⁾ がリボ核酸を培地に加えることで SLS が著しく増産するという「核酸効果 (RNA-effect)」を発見して以来研究は急速に進展したが、リボ核酸による増産機構については今日まで全く不明のままである。一方、菌体内溶血毒素に関する研究も数多くあり、菌体内溶血毒素 (intracellular hemolysin, 以下 ICH と略) に対するリボ核酸などの影響についても検討され、菌体内溶血毒素については次第に明らかにさ

れつつあるが尚不明の点が多く、ことに SLS と ICH ならびにその他の溶血毒素との関係、およびこの際におけるリボ核酸の意義などについては全く不明である。本論文はこれらの点を明らかにするため溶連菌の無細胞抽出液を用いて実験を行ない、核酸効果におけるリボ核酸の意義について検討を行った。

材料および方法

1. 溶連菌株

教室保存の A 群溶連菌 Su 株 (ATCC 21060, type 3, SLS および SLO を産生、以下単に Su 菌と略記) および C 203 U 株 (type 3, SLO のみを産生、以下 C 203 U 菌と略記) を使用した。両菌の継代培養には普通肉汁ブイヨン (pH 7.2) を用いた。

2. 3%酵母エキス培地

Effect of Ribonucleic Acid on Streptolysin S Formation. Yoshinori Hayashi, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University.

Sakurai ら²⁾の方法によって作製した。すなわち、ビール酵母エキス P2G (エビオス薬品工業 K.K.) 30 g を蒸留水 1,000 ml に溶解し、pH を苛性ソーダ液にて 7.4 に調整したのち、100°C に 60 分間加熱し、濾紙にて濾過した濾液の pH を再調整後更に 100°C 30 分間加熱し 3 回濾過を行ってから 500 ml 宛に分注滅菌した。培地は実験のつど作製した。

3. 前培養培地

3%酵母エキス培地 25 ml に普通肉汁ブイヨン 25 ml を加えて滅菌したものを前培養培地として用いた。

4. 培養方法

前培養培地 50 ml に Su 菌または C203 U 菌の普通肉汁ブイヨン培養液 1 ml を接種し、37°C で 18 時間培養したものを 3%酵母エキス培地 500 ml に接種し、37°C で 24 時間静置培養した。

5. 溶連菌の無細胞抽出液 (cell free extract, 以下 CFE と略) の作製

Shoin の方法³⁾によって CFE を作製した。すなわち、供試菌の 3%酵母エキス培養液 500 ml を低温で遠心し、沈澱した生菌体を冷生食水で 2 回洗滌したのち 20 ml の冷蒸留水に浮遊した。この浮遊液を細胞破壊用ガラス瓶 (ブラウン社製、容量 50 ml) にいれ、これにガラス粒 (ブラウン社製、直径 0.10~0.11 mm) 30 g を加えてセルホモジナイザー (ブラウン社製) にて炭酸ガス噴霧下で 4,000 rpm 2 分間 2 回計 4 分間ホモジナイズした。ついでホモジネート液をガラス濾過器 G 2 で濾過し、ガラス粒を除いた濾液を遠心 (500×g, 15 分間) してえた上清液を CFE として用いた。この CFE を遠心 (20,000×g, 20 分間) してえた上清液を CFE-S、沈澱物を CFE-P とした。CFE-P は冷蒸留水で洗滌したのち適量な蒸留水に浮遊して実験に用いた。

6. リボ核酸の分画標品 (ribonuclease-resistant fraction, 以下 RNase core と略)

Bernheimer & Rodbart⁴⁾の変法により RNase core を作製した。すなわち、酵母リボ核酸 (メルク社) 100 g を蒸留水 750 ml に溶解し、炭酸ソーダ液で pH を 7.8 に調整したのち更に蒸留水を加えて全量を 1,000 ml とした。これにリボヌクレアーズ (5 回結晶, NBCo) 100 mg を加えて室温に pH 7.4 から 7.6 に保ちながら 24 時間静置した。ついで同溶液に醋酸ソーダ 100 g を加えて溶解したのち 99%エタノール 740 ml を加え、生じた沈澱を遠心により集め、エタノールで洗滌後乾燥したものを RNase core として実験に用いた。

7. RNase core の分画標品

0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 処理 DEAE-セルロースカラム (2×9 cm) に 10%RNase core 水溶液 1 ml を吸着させたのち、各種濃度の塩化ナトリウムーリ

ン酸緩衝液にて段階的に溶出を行った。塩化ナトリウム 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M ならびに 1.0 M 液にて溶出した溶出液を蒸留水に対し透析後凍結乾燥を行い、それぞれの分画標品を 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M および 1.0 M RNase core とした。

8. 酵 素

トリプシン (2,000 unit/g, 和光純薬工業 KK), パパイン (和光純薬工業 KK), バリダーゼ (Lederle Japan LTD), α -キモトリプシン (Bovine Pancreas, P-L Biochemicals, Inc), ナガーゼ (Nagase, Biochemical LTD), プロナーゼ P (科研化学 KK) および α -アミラーゼ (和光純薬工業 KK) をリン酸緩衝液 (pH 7.0) に 0.1% に溶解した液を実験に用いた。ヒアルロニダーゼ (100 TRV/Amp, 天野製薬 KK) は 100 TRU を 0.4 ml のリン酸緩衝液に溶解して実験に用いた。

9. Bernheimer's Basal Medium

Bernheimer's Basal Medium⁵⁾ (BBM と略記) は マルトース 675 mg, 20% リン酸-カリウム液 (苛性ソーダ液にて pH を 7.0 に調整) 6 ml, 2% 硫酸マグネシウム液 12 ml を蒸留水 66 ml に溶解したものであるが、本実験では マルトース 675 mg, 20% リン酸-カリウム液 6 ml および 2% 硫酸マグネシウム液 12 ml を蒸留水 24 ml に加えた 2 倍濃縮 BBM (×2 BBM と略記) も用いた。

10. SLS 標品

1% RNase core 加普通肉汁ブイヨン培地に Su 菌を接種して 37°C で 30 時間培養し、同培養上清液より Shoin⁶⁾の方法によって Streptolysin S A-I (SLS A-I と略記) 標品を分離し実験に用いた。

11. 静菌法による SLS 産生試験

3%酵母エキス培地培養 Su 菌を集菌洗滌後、培養液の 1/20 容量の 0.1% RNase core-BBM に浮遊させ、同浮遊液を 37°C で静置し、2 時間後に同浮遊液を遠心してえた上清液を静菌法による SLS 液として実験に用いた。

12. 溶血試験

被検液の生食水による 1 ml 宛の倍下稀釈液列を作製し、これに 1 ml の 3% 人血球浮遊液を加えて 37°C 2 時間静置後、被検液の溶血力価を 50% 溶血単位 (HU) で表示した。本実験では一般に CFE 1 ml または CFE-S 1 ml に対する HU で表示した。

成 績

1. 菌体内溶血物質 ICH に関する実験

3%酵母エキス培地 (YE 培地) 500 ml で培養した Su 菌より作製した CFE およびこれを遠心した上清液 (CFE-S) ならびに沈澱物の浮遊液 (CFE-P; CFE 10 ml よ

りの沈澱物を 10 ml の蒸留水に浮遊させたもの) についての溶血試験成績は表 1 の如く CFE は同液中に存在する ICH のため 1,856 HU/ml と最も溶血活性が強く、ついで CFE-S (1,408 HU/ml), CFE-P (180 HU/ml) の順であり、ICH は CFE-S に存在することがみとめられた。SLS 産生能を有しない C203U 菌の CFE, CFE-S および CFE-P にはいずれも溶血活性をみとめなかった。

2. 培地付加 RNase core の ICH に対する影響

RNase core を予め 1% と 0.2% に付加しておいた YE 培地で Su 菌を培養すると、表 2 に示した如くその培養上清液には SLS 産生による強い溶血活性がみられ、RNase core 1% 付加では非添加 (対照) の約 40,000 倍、0.2% 付加では約 8,000 倍の溶血活性が認められた。しかし、これら菌の ICH の溶血活性は RNase core の濃度と逆相関して、0.2% 付加では対照の約 1/2, 1% 付加では 1/7 と減少していた。この培養実験での成績に対し、YE 培地 2,000 ml で培養した Su 菌を 4

等分し、一部はそのまま CFE を作製し、残り 3 部の Su 菌を 0.1% RNase core - BBM に浮遊させて静菌状態での SLS 産生実験を 1 回、3 回および 5 回行ったのちそれぞれの菌体から作製した CFE の溶血試験成績および各 SLS 産生実験での上清液の溶血試験成績は表 3 に示した如くである。SLS 産生は静菌状態での産生実験回数が増加するにともない減少し、上清液の溶血活性は 1 回目の 645 HU/ml から 3 回の SLS 産生試験で約 1/3 に減少したが、3 回目以後は左程の減少はなく 3 回目と 5 回目ではほぼ同じであった。これに対し、産生実験を行なわなかった菌、ならびに 1 回、3 回および 5 回 SLS 産生実験を行った菌の ICH の溶血活性には差は全くみられず、SLS 産生 0 回の菌と 5 回の菌とでも ICH 溶血活性は同じであり、ICH は静菌状態での SLS 産生により影響をうけなかった。

3. RNase core の ICH 溶血活性に及ぼす影響

低温下で Su 菌 CFE (2,800 HU/ml) 1 容量に 10% RNase core 液 0.2 容量および $\times 2$ BBM 液 0.8 容量を加えて 37°C にインキュベーションした混合液から定期的に混合液を採取して行った溶血試験の成績を図 1 に示した。

RNase core を加えない (CFE 1 容量 + $\times 2$ BBM 液 1 容量) では静置時間の経過と共に溶血活性は急速に低下し、30 分では 1/28 の 105 HU/ml に、60 分で 1/350 の 8 HU/ml に減弱し、2 時間では溶血活性は完全に消失した。これに対し (CFE + RNase core + $\times 2$ BBM) では 0 分で溶血活性はすでに 4,800 HU/ml と増強し、以後時間の経過と共に増強して 30 分から 60 分にかけて最高となり、RNase core 付加前の約 6 倍の 17,920 HU/ml となった。60 分以後では溶血活性の低下がみられたが、しかしその減弱度は僅かであり、5 時間後でもその溶血活性は 6,240 HU/ml と RNase core 付加前の CFE の 2.2 倍、付加直後の 1.3 倍であった。

Table 1. Test for hemolytic activity of CFE, CFE-S and CFE-P

Source of CFE*	Hemolytic activity (HU†/ml) of		
	CFE	CFE-S**	CFE-P***
Group A streptococci Su strain (Su cocci)	1,856	1,408	180
Group A streptococci C203U	0	0	0

† One hemolytic unit (1 HU) is the amount of hemolysis causing 50% hemolysis of 3% human erythrocyte suspension under the stated condition.

* CFE: Cell free extract of streptococci homogenized by Braun's cell homogenizer.

** CFE-S: Supernatant of 10 ml of CFE

*** CFE-P: Precipitate of 10 ml of CFE; CFE-P was suspended in 10 ml of distilled water in this experiment.

Table 2. Test for hemolytic activity of supernatant of broth culture and ICH* of hemolytic streptococci strain (Su cocci)

Culture medium in which Su cocci were cultivated	Hemolytic activity (HU/ml) of	
	Supernatant of culture	ICH of Su cocci grown in culture medium
3% Yeast extract broth	< 2	1,920
0.2% RNase core** - 3% Yeast extract broth	8,064	896
1% RNase core - 3% Yeast extract broth	38,912	276

* ICH: Intracellular hemolysin

** RNase core: Ribonuclease resistant fraction of RNA

(CFE+RNase core+ $\times 2$ BBM) 混合液中の RNase core 濃度を色々かえて行った溶血試験の成績は表 4 に示した如く, RNase core 濃度が 0.5% では溶血活性の増強経過は 1% と同様であったが, インキュベーション時間が 0 分, 30 分および 60 分のいずれにおいてもその溶血活性は 1% 濃度の溶血活性より低かった. 作用濃度が 0.2% および 0.1% では両者は似た溶血活性の変化を示し, RNase core 付加直後 (0 分) では混合液の溶血活性は (CFE+ $\times 2$ BBM) 液より強いが同等であったが, 37°C にインキュベートすると時間の経過と共に減少し, 60 分では RNase core 濃度 0.2% で 1/1.2 に, 濃度 0.1% では 1/3.1 に減少し, その減弱度は RNase core が低濃度ほど強かった. これに対して RNase core 非添加の (CFE+ $\times 2$ BBM) の溶血活性減弱度はさらに急で 60 分で溶血活性はほとんど消失した.

RNase core を DEAE-セルローズカラムクロマトグラムで分画溶出した各分画標品および末処置 RNase core を 1% の濃度に (CFE 1 容量+ $\times 2$ BBM 1 容量) 液に加えて 37°C で 60 分間インキュベートして行った溶血試験の成績は表 5 に示した如く, CFE の 1,344 HU/ml より溶血活性が増強したのは 0.6 M RNase core および 1.0 M RNase core のみで, 0.5 M RNase core では溶血活性は認められたが CFE に比べて 1/4.2 と弱く, その他の分画標品でも溶血活性増強作用は弱く, 末処置 RNase core の 1/4 ないし 1/5 であった.

4. RNase core の ICH 溶血活性増強作用に及ぼす Bernheimer's Basal Medium の影響

RNase core の ICH 溶血活性増強に関する実験での Bernheimer's Basal Medium (BBM) の組成は, リン酸-カリウム, 硫酸マグネシウム, マルトースおよび蒸留水であり, これら各組成成分の影響について試験

した. すなわち (CFE 1 容量+10% RNase core 0.2 容量) に完全 $\times 2$ BBM (対照) および 1 組成分または 2 組成分を除いた不完全組成 BBM を 0.8 容量加えて 37°C にインキュベートし, 定時的に被検液を採取し溶血試験を行った. その成績は表 6 に示した如くである.

(CFE+RNase core+生食水) では 30 分で若干溶血活性は増強し, 60 分では 0 分時の 1/1.5 に低下した. これに対し, (CFE+RNase core+BBM またはその成分) では 60 分で 30 分と同等またはさらに増強したのは完全組成の BBM, (リン酸-カリウム+硫酸マグネシウム), (マルトース+リン酸-カリウム) あるいはリン酸-カリウムを含む 4 被検液で, その増強度も

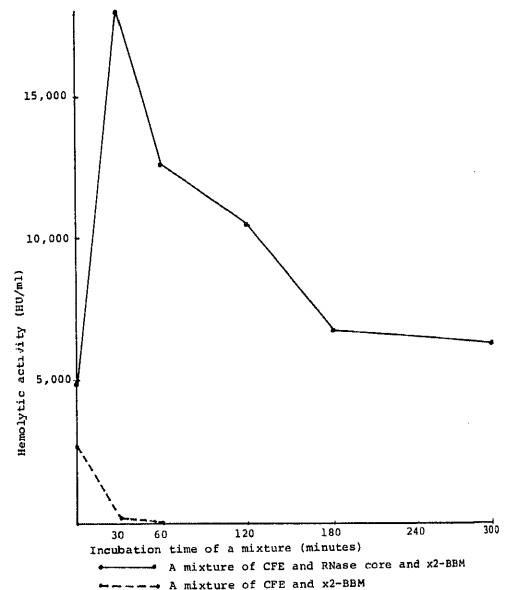


Fig. 1. Change of hemolytic activity of a mixture of CFE and RNase core

Table 3. Test for hemolytic activity of ICH of *Su* cocci after streptolysin S production in resting cell system

Number of times of streptolysin S production	Hemolytic activity (HU/ml) of	
	supernatant	ICH
0	•	1,772
1	645	2,048
3	192	1,843
5	162	1,867

Su cocci harvested from 3% yeast extract broth were suspended in 1/20 volume of 0.1% RNase core-BBM and incubated at 37°C. After 2 hour incubation, the suspension was centrifuged and the supernatant was used for hemolytic activity test. The sedimented cocci were used furthermore 3 and 5 times for streptolysin S production in resting cell system as the above.

BBM> (マルトース+リン酸-カリウム)>リン酸-カリウム> (リン酸-カリウム+硫酸マグネシウム)であり, これらにはリン酸-カリウムが共通してみられた. これに対しリン酸-カリウムを含まない他の被検液では30分で若干の溶血活性増強をみたが, 60分ではいずれも0分時より溶血力は低下した.

5. CFE-SおよびCFE-Pに関する溶血力試験

CFEを遠心してえた上清液CFE-Sおよびその沈澱物CFE-Pの浮遊液(CFE 10 ml よりの遠心沈澱物を1 mlの蒸留水に浮遊させたもの)を用いて(CFE 1容量+10%RNase core 0.2容量+×2 BBM 0.8容

量), (CFE-S 1容量+10%RNase core 0.2容量+×2 BBM 0.8容量), (CFE-P 0.2容量+蒸留水 0.8容量+10%RNase core 0.2容量+×2 BBM 0.8容量)および(CFE-S 1容量+CFE-P 0.2容量+10%RNase core 0.2容量+×2 BBM 0.6容量)ならびにそれぞれの混合液にRNase coreの代りに蒸留水を加えた4混合液(総数8混合液)を用意し, それぞれを37°C60分間インキュベートして行った溶血試験の成績は表7に示した如くである. すなわち, 0分時にはCFE-SにはCFEの1/1.3の溶血活性を, CFE-Pには1/10~1/15の溶血活性をみとめたのは先の実験と同

Table 4. Relation between concentration of RNase core and hemolytic activity of ICH

Concentration of RNase core in a mixture*	Hemolytic activity (HU/ml)		
	Incubation time		
	0 min	30 min	60 min
0%	2,880	150	10
0.1%	2,880	1,360	928
0.2%	3,360	3,040	2,700
0.5%	4,800	8,760	10,560
1.0%	4,640	11,200	12,288

* A mixture of 2ml of CFE, 0.4ml of RNase core solution and 1.6ml of x2-BBM** was incubated at 37°C for stated time, and then this mixture was tested for hemolytic activity.

** x2-BBM: The composition of x2-BBM is 0.765g of maltose, 6ml of 20% KH_2PO_4 (adjusted to pH 7.0 with NaOH), 12ml of 2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 24ml of distilled water.

Table 5. Effect of DEAE-cellulose fractions of RNase core on hemolytic activity of ICH

Fractions of RNase core	Hemolytic activity (HU/ml)
0.4M	20
0.5M	320
0.6M	2,176
1.0M	1,728
Original RNase core	8,704
CFE alone*	1,344

RNase core solution was applied on DEAE-cellulose column and stepwise elution was accomplished using various concentration of NaCl solution. Each eluate was lyophilized after dialyze against distilled water. Fraction 0.4M was fraction eluted by 0.4M NaCl-0.1M phosphate buffer (pH 7.0). A mixture of 1ml of CFE, 0.2ml of 10% fraction of RNase core and 0.8ml of x2-BBM was incubated at 37°C for 2 hours and then this mixture was tested for hemolytic activity.

* CFE was kept under the cold without RNase core or its fraction for 2 hours.

Table 6. Influence of BBM* on enhancement effect of RNase core on hemolytic activity of ICH

Medium in which RNase core and CFE were mixed		Hemolytic activity (HU//ml) Incubation time		
		0 min	30 min	60 min
BBM		2,220	5,120	7,040
BBM deficient in	Maltose	2,016	4,016	3,520
	KH ₂ PO ₄	2,128	2,448	1,952
	MgSO ₄	1,840	4,016	5,600
	KH ₂ PO ₄ and MgSO ₄	1,600	1,600	1,080
	Maltose and MgSO ₄	1,792	3,200	3,680
	Maltose and KH ₂ PO ₄	1,680	1,920	1,240
Physiological saline		1,648	2,000	1,130

A mixture of 1.0 ml of CFE, 0.2 ml of 10% RNase core and 0.8 ml of medium was incubated at 37°C for stated time, and then this mixture was tested for hemolytic activity.

*BBM: Bernheimer's basal medium

Table 7. Effect of RNase core on hemolytic activity of CFE, CFE-S and CFE-P

Composition of a mixture (ml)						Hemolytic activity (HU/ml) of a mixture incubated for	
CFE	CFE-S	CFE-P*	10% RNase core	x2- BBM	H ₂ O	0 min.	60 min.
1.0	0	0	0	0.8	0.2	1,856	<10
1.0	0	0	0.2	0.8	0	3,584	10,752
0	1.0	0	0	0.8	0.2	1,408	<10
0	1.0	0	0.2	0.8	0	1,480	9,728
0	0	0.2	0	0.8	1.0	180	<10
0	0	0.2	0.2	0.8	0.8	<10	160
0	1.0	0.2	0	0.8	0	1,056	<10
0	1.0	0.2	0.2	0.6	0	4,096	18,432

* CFE-P : CFE-P of 10 ml of CFE was suspended in 1 ml of distilled water in this experiment.

Table 8. Effect of trypan blue on hemolytic activity of ICH, RNase core-ICH and streptolysin S

Materials	In the presence (+) or the absence (-) of trypan blue	Hemolytic activity
ICH	+	0 HU/ml
	-	2,800 HU/ml
RNase core-ICH*	+	0 HU/ml
	-	12,000 HU/ml
Streptolysin S A-I	+	0 HU/ml
	-	13,440 HU/mg/ml

* A mixture of 1 ml of CFE-S, 0.2 ml of 10% RNase core and 0.8 ml of x2-BBM was incubated at 37°C for 60 minutes and the mixture was used as RNase core-ICH.

様であったが、37°C 60分でこれらの溶血活性は CFE と同様に消失し、(CFE-S+CFE-P)の混合液においても同じ成績であった。これに対し、RNase coreを加えた混合液では(CFE-P+RNase core+×2 BBM)のみが0分時には10 HU以下であったが、他の混合液ではいずれも0分時においてもRNase coreを加えたことで溶血活性は増加し、特に(CFE-S+CFE-P+RNase core+×2 BBM)での増加は著明で、RNase core非添加の約4倍の溶血活性であった。37°Cで60分間のインキュベーションにより、RNase core添加混合液は(CFE-P+RNase core)を含めてすべて溶血活性は更に増強した。このうち増加度の最も高かったのは(CFE+RNase core+×2 BBM)液であり溶血活性の最も強かったのは(CFE-S+CFE-P+RNase core+×2 BBM)液の18,432 HU/mlで(CFE+RNase core+×2 BBM)の1.7倍であった。これらの成績からRNase coreの添加により既存のICHと異なった溶血物質(以下RNase core-ICHと称す)が生じたと考えられた。

6. ICH, RNase core-ICH および SLS の比較試験

(CFE-S 1容量+10%RNase core 0.2容量+×2 BBM 0.8容量)を37°Cで60分インキュベーションして調製したRNase core-ICH (12,500 HU/ml)とICHとしてCFE-S (2,800 HU/ml)およびSLS A-I液 (13,440 HU/ml)または静菌法によるSLS溶液 (7,680 HU/ml)について下記の如き比較試験を行った。

1) トリパンプルーの溶血拮抗作用に関する比較試験

ICH, RNase core-ICH および SLS A-I の倍下稀釈液列各2列を用意し、1列には3%人血球浮遊液を、他の1列にはトリパンプルーを予め0.1%に加えて

おいた3%人血球浮遊液を加えて行った比較試験の成績は表8の如く、トリパンプルーの存在によってICH, RNase core-ICH および SLS A-I の溶血はいずれも完全に抑制された。

2) 熱安定性に関する試験

ICH, RNase core-ICH および SLS A-I の各溶液を37°Cに静置して30分、60分および2時間後にそれぞれ溶液を採取して行った溶血試験の成績を図2に示した。

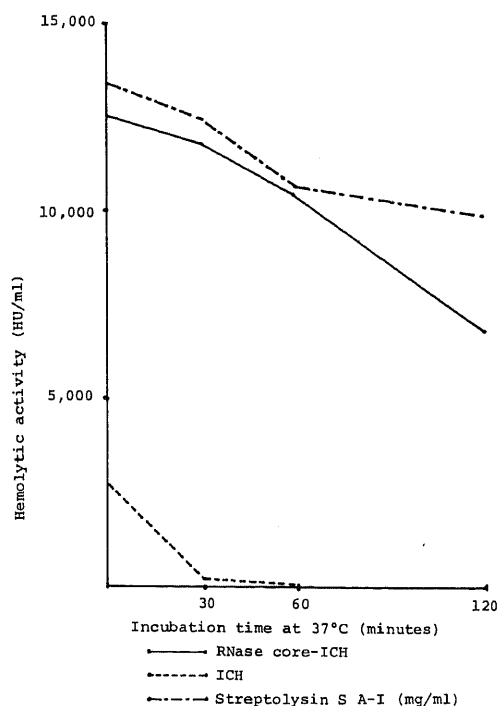


Fig. 2. Experiment on thermostability of ICH, RNase core-ICH and streptolysin S

Table 9. Effect of RNase core on hemolytic activity of inactivated CFE*

Incubation time of a mixture** (minutes)	Hemalytic. activity Dilution of a mixture						
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
0	-***	-	-	-	-	-	-
30	-	±***	+***	+	±	-	-
60	-	±	+	+	+	±	-

* Inactivated CFE, which was previously incubated at 37°C for 60 minutes, did not possess hemolytic activity

** A mixture of 2 ml of inactivated CFE, 0.4 ml of 10% RNase core and 1.6 ml of x2-BBM was incubated at 37°C for stated time.

*** +, ± indicate partial hemolysis; - indicates no hemolysis. (Complete hemolysis is 卍.)

RNase core-ICH および SLS A-I は 37°C では時間の経過と共に溶血活性は若干減弱するが, RNase core-ICH では 30 分で 94%, 60 分で 83%, 2 時間で 54% (6,370 HU/ml) の溶血活性を保持しており, SLS A-I では 30 分で 93%, 60 分で 79%, 2 時間で 74% (9,920 HU/ml) の溶血活性を保持し, 両者は似た経過を示した. これに対し ICH の溶血活性は 37°C で急激に減弱し 30 分で 4% の 105 HU/ml に, 60 分で 0.2% ~ 0% に減弱し, 2 時間では完全に溶血活性を喪失した. 37°C で 60 分間静置して溶血活性が消失した CFE に型の如く RNase core および $\times 2$ BBM を加え, これに更に ATP を 10 mg/ml に加えて 37°C で静置すると 30 分で 192 HU/ml, 60 分で 1,024 HU/ml の溶血活性をみとめた. ATP を加えない CFE+RNase core では表 9 に示した如く 30 分および 60 分で弱い溶血をみとめたが 50% 溶血単位 (HU) を算定することはできなかった. ICH, RNase core-ICH および SLS A-I を 18°C で静置すると 60 分間で ICH は 26% の 730 HU/ml に, SLS では 77% の 10,310 HU/ml に減弱し, 特に ICH ではその減弱度は著明であったが, RNase core-ICH では溶血活性はかえって増強していた. また, 45°C 30 分では ICH は完全に溶血活性を喪失したが, RNase core-ICH では約 50% の 5,976 HU/ml の溶血力価を保持していた.

3) DEAE セルロースカラムクロマトによる比較試験

ICH, RNase core-ICH および 静菌法による SLS 液各 1 ml をそれぞれ 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で処理した DEAE-セルロースカラム (1 \times 2.5 cm)

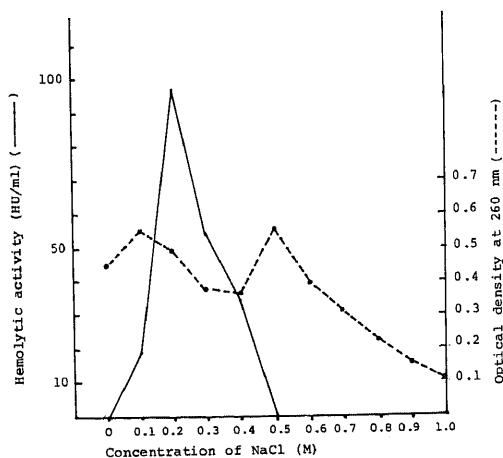


Fig. 3. DEAE cellulose column chromatography of ICH

に吸着させたのち, 3.0 ml の各種濃度 (0 M ~ 1.0 M) の塩化ナトリウム-0.1 M リン酸緩衝液 3 ml により段階的に溶出させ, 各溶出液について溶血活性比較試験および OD 260 nm での吸収度を測定した. なおこの実験操作は全て低温下で行った.

i) ICH

溶血活性は図 3 に示した如く塩化ナトリウム濃度が 0.1 M から 0.6 M までの各溶出液にみられたが, 0.2 M 溶出液が最も強力な 97 HU/ml (同分画溶出の総溶血力価: 291 HU) と ICH の溶血活性の 16% が 0.2 M 溶出液にみられた. ついで 0.3 M 溶出液の 54 HU/ml (総溶血力価 160 HU), 0.4 M 溶出液の 44 HU/ml (総溶血力価 133 HU), 0.1 M 溶出液の 18 HU/ml (総溶血力価 54 HU), 0.5 M 溶出液の 1 HU/ml (総溶血力価 4 HU) の順に溶血活性がみられ, 0.6 M 溶出液では溶血は認められたが 1 HU/ml 以下であった. これら分画溶出液の総溶血力価は ICH (1,800 HU) の 35% であった.

OD 260 nm での吸光度測定成績から, CFE の一部は吸着されなかったが, 大部分は吸着されており, 溶出液の OD 260 nm 吸収値は 0.1 M から漸次低まって 0.4 M で谷となりついで高まって 0.5 M でピークを示し, 0.6 M 以後減少し吸収曲線と溶血活性曲線とは一致しなかった.

ii) RNase core-ICH

溶血活性がみられた溶出液は図 4 に示した如く塩化ナトリウム濃度が 0.3 M から 0.7 M までであった. このうち 0.4 M, 0.5 M および 0.6 M 溶出液で溶血活性は強く, それぞれの溶出液の HU/ml および総溶血力価

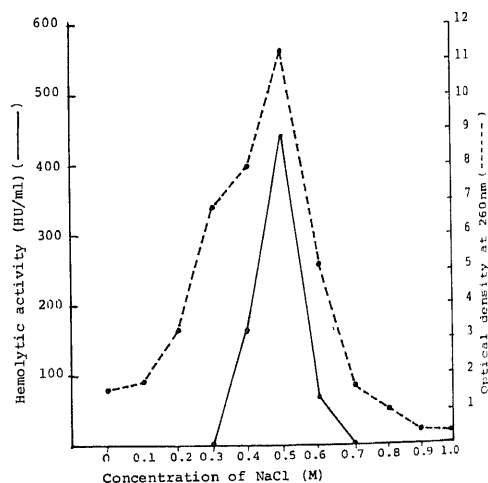


Fig. 4. DEAE cellulose column chromatography of RNase core-ICH

は 158 HU/ml と 474 HU, 437 HU/ml と 1,372 HU, 65 HU/ml と 207 HU および 0.7 M での 4 HU/ml と 13 HU で, 0.5 M 溶出液の溶血活性が最も強かった。またこれらの溶出液の総溶血力価は 2,053 HU で RNase core - ICH の 4,940 HU の 42% であった。0.3 M, 0.8 M, 0.9 M および 1.0 M 溶出液では溶血活性は弱く何れも 1 HU/ml 以下であった。溶出液の OD 260 nm 吸収値は, 0.1 M 溶出液で 1.7 であり, 溶媒濃度が高くなるにつれて大きくなり 0.5 M 溶出液では 11.36 と最高値を示し, 以後 OD 260 nm 吸収値は小さくなり, 1.0 M 溶出液では 0.32 であった。RNase core - ICH では ICH と異なり, 溶血活性曲線と OD 260 nm 吸収曲線はよく相関していた。

RNase core を予め透析し, DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーにおいて, 塩化ナトリウム 0.6 M で溶出した 0.6 MRNase core と CFE - S とで調製した 0.6 M RNase core - ICH (1,344 HU/ml) のカラムクロマトグラフィーは図 5 に示した如く, 溶血活性は 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M および 0.8 M 溶出液にあり, 最高は 0.6 M 溶出液の 120 HU/ml (同分画の総溶血力価: 240 HU), ついで 0.7 M 溶出液の 60 HU/ml (総溶血力価: 120 HU), 0.5 M 溶出液の 10 HU/ml (総溶血力価: 20 HU) の順で, これら 4 溶出液の総溶血力価は 0.6 M RNase core - ICH の総溶血力価の 31% であ

った。OD 260 nm 吸収値は 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M および 0.8 M 溶出液に強くみられ, 特に 0.6 M および 0.7 M 溶出液で高くそれぞれ 34 および 29 であり溶血活性曲線とよく一致していた。

iii) SLS

静菌法により作製した SLS 液 (7,680 HU/ml) を透析したのちカラムクロマトグラフィーを行った成績は図 6 に示した如くである。すなわち, 溶血活性は 0.1 M から 0.3 M 溶出液には全くみられず, 0.4 M 溶出液からみられ, 0.4 M 溶出液で 95 HU/ml (総溶血力価: 285 HU), 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M, 0.8 M, 0.9 M および 1.0 M 溶出液の溶血活性および総溶血力価はそれぞれ 1,350 HU/ml と 4,047 HU, 430 HU/ml と 1,292 HU, 74 HU/ml と 223 HU, 34 HU/ml と 104 HU, 10 HU/ml と 30 HU および 6 HU/ml と 17 HU であり, これらの各溶出液による総溶血力価は 5,997 HU で, SLS 液の 78% であった。

OD 260 nm 吸収値は 0.1 M 溶出液で 0.116 であり, 溶媒の濃度が高くなるにつれて吸収値も増加し, 0.5 M 溶出液で最高の 0.7 を示し, 以後溶媒濃度が高くなるにつれて吸収値は減少して 0.6 M で 0.498, 0.8 M で 0.128, 1.0 M で 0.07 であった。

4) ICH, RNase core - ICH および SLS の溶血活性に及ぼす各種酵素の比較影響試験

(CFE または SLS A - I 溶液 1 ml + 0.1% 酵素溶液 0.2 ml + 蒸留水 0.8 ml) および (RNase core - ICH 1.8

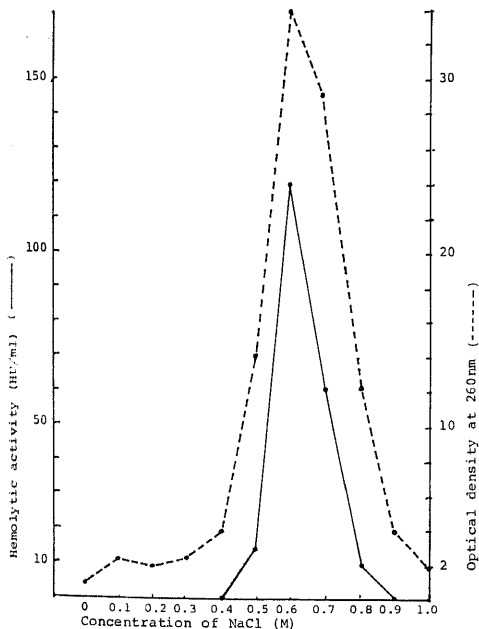
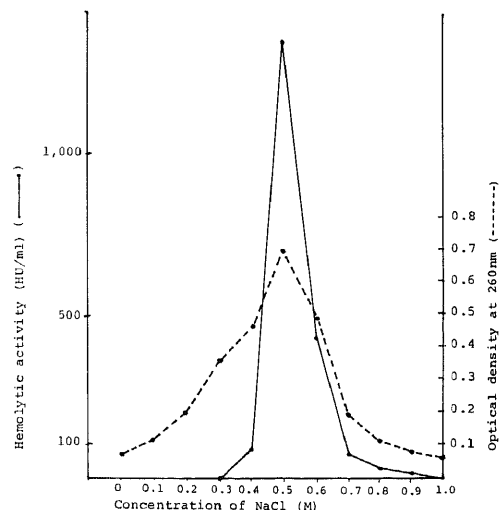


Fig. 5. DEAE cellulose column chromatography of 0.6M RNase core-ICH



*Streptolysin S was prepared by resting cell system.

Fig. 6. DEAE cellulose column chromatography of streptolysin S*

ml+0.1%酵素溶液0.2 ml)の被検混合液を18°Cで60分間静置したのち、これらについて溶血試験を行った。なお、酵素溶液のかわりに0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.2 ml を加え、同様の処置を行ったものを対照とした。溶血試験の成績は表 10 に示した如くである。なお、(RNase core - ICH + 酵素溶液)の溶血単位は CFE - S 1 ml 当りの 50%溶血単位に換算して表示した。

酵素溶液を加えない ICH の溶血活性は 18°C60 分間で 1,741 HU/ml から約 1/4 の 454 HU/ml に減弱し、トリプシン、バリダーゼ、ヒアルロニダーゼおよび α -アミラーゼを加えたものでは 60 分で溶血活性の減弱をみたが、その溶血活性の減弱度は対照の溶血活性の減弱度とほぼ同じであり、酵素による影響とはみられなかった。これに対しキモトリプシンを加えたものでは 60 分で溶血活性は 108 HU/ml と対照の約 1/4 となり、キモトリプシンによる影響がみられた。パパイン、ナガーゼおよびプロナーゼによって ICH の溶血活性は強く減弱し、特にプロナーゼでは溶血活性は完全に失活し、ナガーゼでは 1/100 に、パパインでは 1/9 に減弱した。

RNase core - ICH では、対照液は 60 分で溶血活性の減弱が全くみられずインキュベート前と同じ 5,632 HU/ml であった。トリプシン、バリダーゼおよびアルロニダーゼによって RNase core - ICH の溶血活性は対照に比してそれぞれ 1/1.5, 1/1.15 および 1/1.27 と僅かであったが減少し、キモトリプシンによつては 1/2.2 に減弱した。パパイン、ナガーゼ、プロナーゼおよび α -アミラーゼによつては対照の 1/19, 1/140, 1/22 および 1/11 と強く減弱しこれらの酵素による影響が大

きかった。

SLS A - I 液 (13,440 HU/ml) は 18°C60 分の処置でも溶血活性は 14,427 HU/ml と減弱はみられず、トリプトシンによつても全く影響されなかったが、ヒアルロニダーゼにより 1/1.2 の 12,000 HU/ml に減弱した。バリダーゼおよび α -アミラーゼによつて 1/2 と 1/6 に減弱し、パパイン、キモトリプシン、ナガーゼおよびプロナーゼによつては著明に影響され、対照の 1/28, 1/15, 1/40 および 1/294 に減弱した。

考 察

溶連菌の菌体外溶血物質は Marmorek により始めて 1895 年に報告され、ついで、Weld により Weld's Toxin⁷⁾が発表され、さらに Todd⁸⁾により溶血性物質には酸素に不安定な Streptolysin O と酸素に安定な Streptolysin S (SLS) の二種類があることが明らかにされた。SLS については、1940 年 Okamoto¹⁾が酵母リボ核酸を溶連菌培地に加えることで SLS が著しく増産するという、いわゆる「核酸効果 RNA effect」を発見し、これについて岡本ら^{9,10)}、Bernheimer ら^{4,11)}、Koyama ら¹²⁾および Hosoya ら¹³⁾らは多くの研究を行ない SLS 産生に影響を及ぼす種々の条件・因子など、ならびに SLS および RNA の生物・理・化学的性状などについて多くの知見を発表した。また、Herbert ら¹⁴⁾は菌液に血清タンパク分画を加えると溶血性物質が産生することを発表し、別に Ginsburg ら^{15,16)}は菌液に Tween 40, 60 および 80 などの detergents が存在すると溶血性物質が産生することを報告し、これを Streptolysin D と名付けた。

Table 10. Effect of various enzymes on hemolytic activity of ICH, RNase core-ICH and streptolysin S

Enzymes	Hemolytic activity (HU/ml)		
	ICH	RNase core-ICH	Streptolysin S A-I
Trypsin	384	3,712	14,000
Papain	52	296	478
Varidase	419	4,856	7,400
Chymotrypsin	108	2,560	962
Nagase	5	40	360
Pronase	0	256	49
Hyaluronidase	576	4,429	12,022
α -Amylase	515	496	2,405
None*	454	5,632	14,427
None**	1,741	5,440	13,340

Each hemolysin was incubated with various enzymes (each 0.1 mg/ml) for 60 minutes at 18°C.

*Each hemolysin was incubated without enzyme for 60 minutes at 18°C.

**Each hemolysin was incubated without enzyme for 60 minutes at 0°C.

菌体内溶血物質については Schwab¹⁷⁾が 1956 年菌体を超音波で破壊した上清液に溶血性物質が存在することを見出し、これを intracellular hemolysin (ICH) と名付け、その他に Ginsburg ら¹⁵⁾は溶連菌と赤血球を混合接触させると溶血がおこることを報告しこれを cell bound hemolysin (CBH) と名付けた。このように溶連菌の溶血性物質は複雑に分類されるに至ったが、これら各溶血性物質間の関係については全く不明であった。ついで、無細胞抽出液 (CFE) に対する核酸、タンパクならびに detergent などの影響について研究が行われ、Maruyama ら¹⁸⁾、Koshimura ら¹⁹⁾、Taketo ら²⁰⁾ および Calandari²¹⁾らはそれぞれの方法によって菌体を破壊・処理してえた CFE に RNA 標品を加えて試験管内で溶血性物質の産生実験を行った。これらの実験から CFE 中の ICH の moiety が RNA、血清タンパク分画や detergents などの carrier に移行結合することによりそれぞれの溶血性物質 RNA-ICH や Streptolysin D が形成され、これら形成された溶血性物質の性状はその carrier によって定まるものであり、また carrier と結合した moiety は他の carrier に移行することが明らかにされ、各溶血性物質間の関係について若干明らかにされると共に、RNA-ICH と SLS は非常に類似していることも実証された。本論文においてもカラムクロマトグラフィーなどの実験からも同様の成績がえられている。しかし、RNA-ICH については管内での CFE と RNA の実験であり、ICH と菌体外 RNA 或いは SLS との関係についてはほとんど触れられていなかった。これについて本論文では、増殖培地中に RNase core を加えると培地中には著しい SLS の増産がおこるが、同時に ICH は減少し、ICH と培地 RNase core の濃度とは負の相関関係にある成績をえた。これは ICH が菌体外に産出され培地中の RNase core と結合して SLS を形成することを示唆するものと考えられた。これに対し静菌法による SLS 産生実験で ICH に変化がみられなかったのは、菌体内 ICH に比して産生された SLS が非常に少ないためと解された。また、RNase core-ICH は ICH に比して温度に対してより安定であり、また溶血活性も強いが、ICH と RNase core を作用させて RNase core-ICH を調製する時、これに CFE の遠心沈殿物 (細胞壁など) を加えると RNase core-ICH の溶血活性がさらに増加した。このことは細胞壁などが何らかの作用をもつことを示唆するものであり、生菌体により産生される SLS が管内で形成された RNase core-ICH の溶血活性より強力であることも説明できる。また、ICH が細胞壁を通して菌体外に産生されるとき、一部が細胞壁にあることも考えられ、これが Ginsburg のいう cell bound hemo-

lysin と考えられる。Calandar ら²²⁾は最近超遠心器を用いて ICH は membrane に局在するとしており、これらについては更に検討が必要である。

CFE に RNase core を加えないで温度処理すると ICH の失活で CFE の溶血性は消失するが、この CFE に RNase core を加えると溶血活性が再び認められ、これに ATP を加えると溶血力の再生がさらに高まることは、CFE には ICH のほかにこれを合成する系か前駆物質があり、合成または前駆物質の変換にはエネルギーを必要とするものであり、また、この合成系または前駆物質は温度に対して ICH より安定であると考えられた。しかし、RNase core が合成系を刺激促進するのか、或いは前駆物質として溶血性を発揮するののかは全く不明であり、さらに実験が必要である。

以上の成績から岡本による核酸効果は菌体内での合成系→ICH→細胞壁を介して RNase core との結合→SLS 生成が想定され、RNase core によってこの反応がさらに促進されると考えられた。従って単に RNase core と ICH を管内で反応させた RNase core-ICH と生菌体により産生された SLS とでは一部はカラムクロマトグラフィー、trypan blue の影響、溶血様式などの如く類似した性状がみられるが、一部では溶血活性や酵素による影響実験の如きちがいがみられたのは当然と考えられた。すなわち、各酵素による実験でパリターゼ、キモトリプシン、トリプシンに対して RNase core-ICH は SLS よりも ICH と似た成績を示し、パパイン、ヒアルロニダーゼおよび α -アミラーゼに対して RNase core-ICH は SLS と似た成績を示している。このことは RNase core-ICH は SLS と ICH の中間に位置することを意味するものであり SLS は ICH と RNase core の単なる moiety の移行・結合によるものではないと考えられた。これらについてさらに検討が必要である。

結 論

核酸効果におけるリボ核酸および SLS と菌体内溶血物質 (ICH) の関係を明らかにするため、溶連菌の無細胞抽出液 (CFE) を用いて実験を行い次の如き成績をえた。

1) SLS 産生溶連菌 Su 株の CFE には ICH による強い溶血活性がみられ、ICH と SLS 産生とは逆相関関係を示し、RNase core により SLS を多量に産生した Su 菌の ICH 溶血活性は低下していた。

2) CFE を RNase core で処理した RNase core-ICH は易熱性の ICH に比して耐熱性となり、溶血活性も増強していた。この溶血活性増強は CFE の遠心沈殿物の存在によって更に強められた。

3) ICH, RNase core - ICH および SLS の溶血作用はトリパンブルーによって共に抑制された。

4) DEAE セルローズカラムクロマトによる実験では RNase core - ICH と SLS は似た態度を示し、溶血活性と OD 260 nm 吸収値は相関していた。

5) RNase core - ICH はトリプシン、バリダーゼ、キモトリプシンによって ICH と同じ影響をうけ、 α -アミラーゼ、ヒアルロニダーゼ、パパインによって SLS と同様な影響をうけた。これらの成績から RNase core - ICH は ICH と SLS との中間にあるものと考えられた。

5) 加熱により失活した CFE を RNase core と ATP で処理すると溶血活性が再び認められた。

以上の成績から SLS 産生溶連菌体内で合成され、貯蔵された ICH が細胞壁の介在で RNase core と結合し、SLS として菌体外に産生され、また RNase core はこれらの過程を促進するものと考えられた。

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りまして恩師正印達教授に衷心より深甚な謝意を表します。

文 献

- 1) Okamoto, H.: Über die hochgradige Steigerung des Hämolyisinbildungsvermögens des *Streptococcus haemolyticus* durch Nukleinsäure. I Mitt. Japan J. Med. Sci., IV Pharmacol., 12, 167 - 208 (1940).
- 2).
- 2) Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S. & Takagaki, Y.: Tumor inhibiting effect of a streptococcal preparation (NSC - B 116209). Cancer Chemother. Rep. Part 1., 56, 9 - 17 (1972).
- 3) Shoin, S.: Studies on the anticancer factor(s) from group A streptococci Part 1. Isolation and fractionation of cell - free extract from streptolysin S - forming streptococci. Gann, 67, 661 - 667 (1976).
- 4) Bernheimer, A. W. & Rodbart, M.: The effect of nucleic acids and of carbohydrates on the formation of streptolysin. J. Exp. Med., 88, 149 - 168 (1948).
- 5) Bernheimer, A. W.: Formation of a bacterial toxin (streptolysin S) by resting cells. J. Exp. Med., 90, 373 - 392 (1949).
- 6) Shoin, S.: On the stabilizing effect of silver salts upon streptolysin S. Jpn. Exp. Med., 24, 13 - 19 (1954).
- 7) Weld, J. T.: The toxic properties of serum extracts of hemolytic streptococci. J. Exp. Med., 59, 83 - 96 (1934).
- 8) Todd, E. W.: The differentiation of two distinct serological varieties of streptolysin O and streptolysin S. J. Pathol. Bacteriol., 47, 423 - 445 (1938).
- 9) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.: Studies on the anticancer and streptolysin S - forming activities of hemolytic streptococci. Jpn. J. Microbiol., 11, 323 - 336 (1967).
- 10) Okamoto, H., Shoin, S. & Koshimura, S.: Streptolysin S - forming and antitumour activities of group A streptococci, p259 - 289. In J. Jeljaszewicz & Wadström (ed.), Bacterial toxins and cell membranes, Academic Press, London, New York, San Francisco, 1978.
- 11) Bernheimer, A. W.: Streptolysins and their inhibitors, p19 - 38. In M. McCarty (ed.), Streptococcal infections, University Press, New York, 1954.
- 12) Koyama, J., Sokawa, Y. & Egami, F.: Chemical nature and biosynthesis of streptolysin S. Biochem. Z., 338 206 - 216 (1963).
- 13) Hosoya, S., Hayashi, T., Homma, Y., Egami, F., Shimomura, M & Yagi, Y.: Studies on the hemolysin of hemolytic streptococci Part II The hemolysin obtained by shaking a mixture of hemolytic streptococci with nucleic acid solution. Jpn. J. Exp. Med., 20, 25 - 36 (1949).
- 14) Herbert, D. & Todd, E. W.: The oxygen - stable haemolysin of group A haemolytic streptococci (streptolysin S). Br. J. Exp. Pathol., 25, 242 - 254 (1944).
- 15) Ginsburg, I. & Grossowicz, N.: A cell - bound hemolysin of group A streptococci. Bull. Res. Coun. Israel, E7, 237 - 246 (1958).
- 16) Ginsburg, I.: Streptolysin S. p99 - 171. In T. C. Montie, S. Kadis & S. J. Ajl (ed.), Microbial toxins Volume III, Academic Press, New York and London, 1970.
- 17) Schwab, J. H.: An intracellular hemolysin of group A streptococci I. Influence of sonic energy and pH on hemolytic potency. J. Bacteriol., 71, 94 - 99 (1956).
- 18) Maryuama, Y., Sugai, S. & Egami, F.: Formation of streptolysin S by streptococcal proto-

plasts. *Nature*, **184**, 832 - 833 (1959).

19) Koshimura, S. & Shoin, S.: Experimental anticancer studies Part 13 On the streptolysin S - synthesizing and anticancer activities of cell - free extract from living hemolytic streptococci. *Gann*, **51**, 309 - 318 (1960).

20) Taketo, A. & Taketo, Y.: Biochemical studies in streptolysin S formation. I. Streptolysin S formation in cell free system. *J. Biochem.*, Tokyo,

56, 552 - 561 (1967).

21) Calandra, G. B. & Oginsky, E. L.: Cellular streptolysin S - related hemolysins of group A streptococcus C203S. *Infect. Immun.*, **12**, 13 - 28 (1975).

22) Calandra, G. B. & Cole, R. M.: Membrane and cytoplasmic location of streptolysin S precursor. *Infect. Immun.*, **31**, 386 - 390 (1981).

Effect of Ribonucleic Acid on Streptolysin S Formation Yoshinori Hayashi, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - *J. J. J. Med. Soc.*, **91**, 561 - 573 (1982)

Key words: Hemolytic streptococci, Intracellular hemolysin, Streptolysin S, RNA

Abstract

Intracellular hemolysin (ICH) found in cell free extract (CFE) of streptolysin S-forming streptococci homogenized by Braun's cell homogenizer decreased by addition of ribonuclease-resistant fraction (RNase core) of RNA to a culture medium, in inverse proportion to the increase of extracellular production of streptolysin S (SLS). Hemolytic activity of ICH was enhanced about 5 times by incubating CFE at 37°C with RNase core in the Bernheimer's basal medium; this treatment might make a complex of RNase core-ICH due to a transfer of the moiety of ICH to RNase core, as had already been reported. The hemolytic activity was further enhanced by addition of precipitates (cell walls etc.) of streptococcal homogenates. The behavior in column chromatography and the thermo-stability of RNase core-ICH resembled those of SLS, but differed from those of ICH. Furthermore, the hemolytic activity of RNase core-ICH was decreased as much as SLS by treatment with hyaluronidase or α -amylase, both of which did not affect ICH at all. On the other hand, the hemolytic activity of both RNase core-ICH complex and ICH alone was similarly affected by varidase, chymotrypsin and trypsin, unlike from SLS. When CFE, preinactivated at 37°C, was incubated with RNase core and ATP at 37°C, the hemolytic activity was observed again, suggesting that hemolysin was newly synthesized. The present results confirmed that SLS appeared to be produced extracellularly by making a complex of ICH, synthesized and pooled in the coccal body, with RNase core under participation of cell walls etc., resulting in a marked enhancement of both hemolytic activity and thermo-stability. RNase core was assumed to stimulate the synthesis of hemolysin.